

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication : **2 646 439**
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

(21) N° d'enregistrement national : **89 06023**

(51) Int Cl^s : C 12 P 19/00, C 07 H 13/06//B 01 F 17/38,
C 12 N 9/10, 11/08

(12)

BREVET D'INVENTION

B1

(54) PROCÉDE POUR LA PREPARATION DE SUCROESTERS PAR REACTION D'UN SUCRE ET D'UN ACIDE GRAS EN MILIEU SOLVANT ET EN PRESENCE D'UNE ENZYME, ET SUCROESTERS AINSI PREPARES

(22) Date de dépôt : 28.04.89.

(30) Priorité :

(60) Références à d'autres documents nationaux apparentés :

(71) Demandeur(s) : GATTEFOSSE SA SOCIETE ANONYME. -FR.

(43) Date de la mise à disposition du public de la demande : 02.11.90 Bulletin 90/44.

(45) Date de la mise à disposition du public du brevet d'invention : 11.02.94 Bulletin 94/06.

(56) Liste des documents cités dans le rapport de recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

(72) Inventeur(s) : NADIA KHALED KHODJA - JEAN KLEIN - BRUNO MAHLER - JEAN GRAILLE - DIDIER MONTET

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : CABINET LAURENT

FR 2 646 439 - B1



PROCEDE POUR LA PREPARATION DE SUCROESTERS PAR REACTION
D'UN SUCRE ET D'UN ACIDE GRAS EN MILIEU SOLVANT ET EN
PRESENCE D'UNE ENZYME, ET SUCROESTERS AINSI PREPARES.

5 L'invention, à laquelle a collaboré l'Institut de
Recherche pour les Huiles et Oléagineux-IRHO, concerne
un procédé pour la préparation par synthèse de sucroes-
ters par réaction d'un sucre et d'un acide gras en mi-
lieu solvant et en présence d'un catalyseur enzymatique;
10 elle se rapporte également aux sucroesters préparés de
la sorte.

Il est bien connu de préparer des sucroesters par
réaction d'un sucre et d'un acide gras en présence d'une
15 enzyme, telle que notamment d'une lipase. Ces sucroes-
ters sont recherchés dans de nombreuses applications,
notamment dans l'industrie pharmaceutique, des cosméti-
ques ou dans les préparations alimentaires, diététiques
notamment.

20

Dans le document JAOCS (1984) 61, 1761-1765, SEINO
et al ont proposé d'estérifier des sucres (sucrose,
glucose, fructose, sorbitol) avec des acides gras (aci-
des stéarique, oléïque, linoléïque) en présence d'une
25 enzyme, à savoir la lipase non spécifique de Candida
cylindracea, et en milieu aqueux tamponné. Cette techni-
que ne permet pas d'obtenir des quantités significatives
de sucroesters et ne répond pas aux exigences de l'in-
dustrie.

30

Dans le document JACS (1984) - 106, 2687-2992 et
(1988) 110, 584-589, KLIBANOV et al ont proposé de tra-
vailler en milieu solvant anhydre, à savoir dans la
pyridine, et en présence de poudre brute de pancréas de
35 porc (catalyseur enzymatique). Ce procédé qui donne des

résultats intéressants, n'est malheureusement pas exploitable sur le plan industriel, car, d'une part, actuellement la poudre de pancréas reste coûteuse et, d'autre part et surtout, l'emploi de pyridine est totalement prohibé, car trop toxique.

L'invention pallie ces inconvénients. Elle vise un procédé d'estérification enzymatique du type en question en milieu solvant, qui soit économique, facile à mettre en oeuvre, industrialisable, et qui donne d'excellents rendements et conduise à des molécules facilement exploitables, car sensiblement exemptes de toutes traces de réactifs résiduels.

15 Le procédé de l'invention pour la préparation de sucroesters par réaction d'un sucre et d'un acide gras en milieu solvant et en présence d'un catalyseur enzymatique, se caractérise en ce que le milieu solvant est constitué par un composé choisi dans le groupe comprenant les alcools tertiaires et l'alcool isopropylique.

En d'autres termes, l'invention consiste à avoir déterminé que lorsqu'on effectue la réaction d'estérification en milieu solvant d'alcool tertiaire, non seulement on peut travailler dans des conditions industrielles, mais on obtient également non seulement un bon rendement et surtout des produits industriellement exploitables.

30 La mise en oeuvre de milieu solvant alcoolique dans une réaction d'estérification n'est pas habituelle, car les fonctions alcools ont tendance à réagir avec les fonctions acides de l'acide gras réactif, pour donner des esters composites complexes, néfastes et en tout cas non recherchés. La sélection d'alcools tertiaires cons-

titue donc une rupture par rapport aux enseignements actuels de la technique. Comme cette rupture conduit à une solution simple, efficace, industrielle, et permet d'obtenir des produits d'excellente qualité ; elle pro-
5 cède donc bien de l'activité inventive.

Comme "sucres", on peut utiliser tous les composés connus comme tels, surtout ceux de la famille des -oses, mais également des composés structuralement analogues,
10 tels que le sorbitol ou les oligo-glycérols. De préférence, on fait appel à des sucres choisis dans le groupe comprenant le mannitol, le sorbitol, la sorbose et le fructose. On a observé que l'on obtenait les meilleurs résultats avec le fructose. La quantité de sucres que
15 l'on doit introduire dépend évidemment de la solubilité de ceux-ci dans le milieu alcoolique choisi.

Comme "acides gras", on peut utiliser tous les acides connus, saturés ou non, à nombre pair ou impair
20 d'atomes de carbone, linéaires ou branchés, et dont le nombre d'atomes de carbone est supérieur à C₄. On peut citer en pratique l'acide oléique, stéarique, isostéarique, béhénique, palmitique, laurique, linoléique, linolénique, caproïque, caprylique, caprique, gamalino-
25 léique, arachidonique, eicosapentaénoïque.

Comme "milieu solvant alcoolique", on utilise comme déjà dit des alcools tertiaires. Ces alcools peuvent être seuls ou en mélange. On utilise de préférence un
30 alcool choisi dans le groupe comprenant le tertibutanol (TB), le méthyl 3 pentanol 3 (M₃P₃). On a observé que l'on obtenait les meilleurs résultats avec le méthyl 2 butanol 2 (M₂B₂).

Il importe de mettre en oeuvre des composés aussi anhydres que possible, car la présence d'eau, certes nécessaire pour le catalyseur limite le rendement en déplaçant la réaction dans le sens de l'hydrolyse. L'eau 5 produite au cours de la réaction d'estérification est entraînée avec le milieu solvant alcoolique.

Comme "catalyseur enzymatique", on fait appel à tous les catalyseurs connus de ce type. De préférence, 10 on utilise des acyl-transférases, notamment greffées. On obtient de bons résultats avec la lipase du Mucor miehei. On utilise de préférence cette lipase greffée sur une résine macro-poreuse échangeuse d'anions. On a observé qu'avec ce composé à grande surface spécifique, 15 on obtenait les meilleurs rendements pour une quantité de lipase voisine de cent milligrammes par mole de sucre.

La manière dont l'invention peut être réalisée et 20 les avantages qui en découlent ressortiront mieux des exemples de réalisation qui suivent, à l'appui de la figure unique annexée qui est une représentation schématique sommaire d'une installation pour la mise en oeuvre du procédé de l'invention.

Dans cette figure unique, la référence (1) désigne la solution préalablement préparée de sucre, d'acide gras et de solvant que l'on envoie dans le réacteur (2), par exemple du type constitué par un tube fermé à double enveloppe, contenant le catalyseur (3). Sauf indication contraire, dans les exemples suivants, on utilise comme enzyme une résine macro-poreuse échangeuse d'anions sur laquelle a été greffée la lipase Mucor miehei, commercialisée par NOVO sous la marque "LIPOZYME", dont l'activité d'interestérification normalisée est égale à 25 BIU/grammes. Le milieu (4) sorti du réacteur (2) est soumis à une séparation poussée (5), telle qu'une dialyse, voire une ultra-filtration, pour séparer le sucroester (6) des excès de réactifs et de solvant (7) que l'on recycle en (8) dans le réacteur (2). La solution (1) est préparée de manière connue dans un récipient (9) chauffé à une température voisine de celle recherchée dans le réacteur (2), par exemple de 55°C, pour obtenir la solubilité optimale du sucre et éviter la recristallisation de celui-ci.

On verse dans ce récipient (10) sous légère agitation le sucre dans la quantité choisie d'alcool jusqu'à dissolution du sucre. La proportion du sucre dissous dans l'alcool considéré est guidée par la limite de solubilité de ce sucre. On ajoute ensuite l'acide gras voulu. Comme cet acide est facilement soluble, la dissolution se fait instantanément.

Exemple 1 :

Dans deux cent millilitres de méthyl 2 butanol 2 (M_2B_2) sous agitation à 55°C, on dissout deux grammes de fructose jusqu'à solubilisation complète.

5 On ajoute ensuite 31,33 grammes d'acide oléique. On obtient ainsi dans le milieu un rapport molaire de une mole de fructose pour dix moles d'acide oléique.

On envoie alors ce mélange réactionnel (1) dans un réacteur (2) à lit fixe enzymatique, contenant neuf
10 grammes de LIPOZYME (marque déposée de NOVO) pendant deux heures. On suit l'évolution de la réaction par chromatographie en couche mince.

Lorsqu'on est en régime permanent, on envoie un nouveau mélange réactionnel (1). On recueille alors en
15 sortie du réacteur (4), un mélange réactionnel que l'on évapore sous pression réduite. Le résidu redissout dans l'hexane est filtré puis dialysé.

Dans le perméat (7), on retrouve l'excès d'acide
20 oléique et dans le retentat (6) on recueille 2,4 grammes d'oléate de fructose (mélange de mono et de di-oléates de fructose) que l'on identifie par chromatographie sur couche mince. On obtient un rendement de réaction de 50%, mais avec la possibilité de recycler les réactifs
25 (7) qui n'ont pas réagi.

La réaction permet en outre de préserver la structure chimique du synthon, ce que ne permet pas d'obtenir les autres réactions chimiques connues à ce jour. Les
30 esters de fructose préparés conformément à l'invention présentent donc des avantages biologiques appréciables.

Après la séparation (5), la pureté de l'oléate de fructose (6) obtenue est d'au moins 95 %, ce qui est également original.

Le produit final obtenu est un liquide visqueux.

5

Exemple 2 :

On répète l'exemple 1 en remplaçant le fructose par du sorbose.

On obtient un rendement de 34 %.

10

Exemple 3 :

On répète l'exemple 1 en remplaçant le fructose par du sorbitol

15 On obtient un rendement de 35 %.

Exemple 4 : on répète l'exemple 1 en remplaçant le fructose par du mannitol. On obtient un rendement de 20 %.

20

Exemple 5 :

On répète l'exemple 1 en remplaçant l'acide oléique par de l'acide palmitique.

25 On obtient un rendement de 50 %.

Exemple 6 :

On répète l'exemple 1 en remplaçant le M_2P_2 par du TB.

30 On obtient un rendement de 39 %.

Exemple 7 :

On répète l'exemple 1 en remplaçant le M_2B_2 par du M_3P_3 .

35 On obtient un rendement de 39 %.

Exemple 8 :

On répète l'exemple 1 en remplaçant le M_2B_2 par l'isopropanol, on obtient un rendement de 5 %.

5 Exemple 9 :

On répète l'exemple 1 en remplaçant le solvant M_2B_2 par de l'hexane.

Le mélange réactionnel obtenu en sortie de réacteur
10 (4) est pratiquement exempt de sucroester.

Exemple 10 :

On répète l'exemple 1 en présence d'eau tamponnée conformément aux enseignements de SEINO visé dans le
15 préambule. On constate que l'on n'obtient pratiquement pas de sucroester.

Le procédé selon l'invention présente de nombreux avantages par rapport aux procédés connus à ce jour. On
20 peut citer :

- le fait de travailler selon un procédé enzymatique mais en phase homogène ;
- la facilité de manipulation et d'industrialisation ;
- 25 - la possibilité de réaliser un procédé totalement continu qui n'affecte pas les propriétés globales de la molécule.

De la sorte, ce procédé de préparation de sucroes-
30 ters peut être utilisé pour toutes les applications connues de ces composés. On peut citer la fabrication d'émulsifiants pour l'industrie pharmaceutique, pour la cosmétologie, pour l'industrie alimentaire, notamment la préparation de produits diététiques.

REVENDICATIONS

5 1/ Procédé pour la préparation de sucroester par réaction d'un sucre et d'un acide gras en milieu solvant alcool tertiaire et en présence d'un catalyseur enzymatique, caractérisé en ce que le milieu solvant est le méthyl-2-butanol-2.

10

2/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé :

- en ce que le sucre est choisi dans le groupe comprenant le mannitol, le sorbitol, le sorbose et le fructose ;
- 15 - en ce que l'acide gras est choisi dans le groupe comprenant l'acide oléique, stéarique, isostéarique, béhénique, palmitique, laurique, linoléique, linolé-nique, caproïque, caprylique, caprique, gamalinoléique, arachidonique, eicosapentaénoïque ;
- 20 - et en ce que le catalyseur est une acyltransférase greffée.

3/ Procédé selon la revendication 1, caractérisée en ce que le sucre est le fructose, l'acide gras est 25 l'acide oléique, le solvant est le méthyl-2-butanol-2, et le catalyseur est la lipase du *Mucor miehei*.

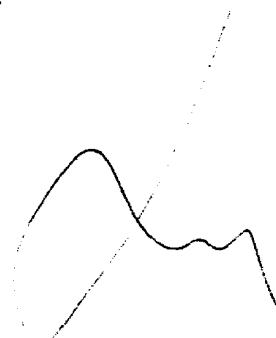
4/ Sucroester obtenu par la mise en oeuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 3.

30

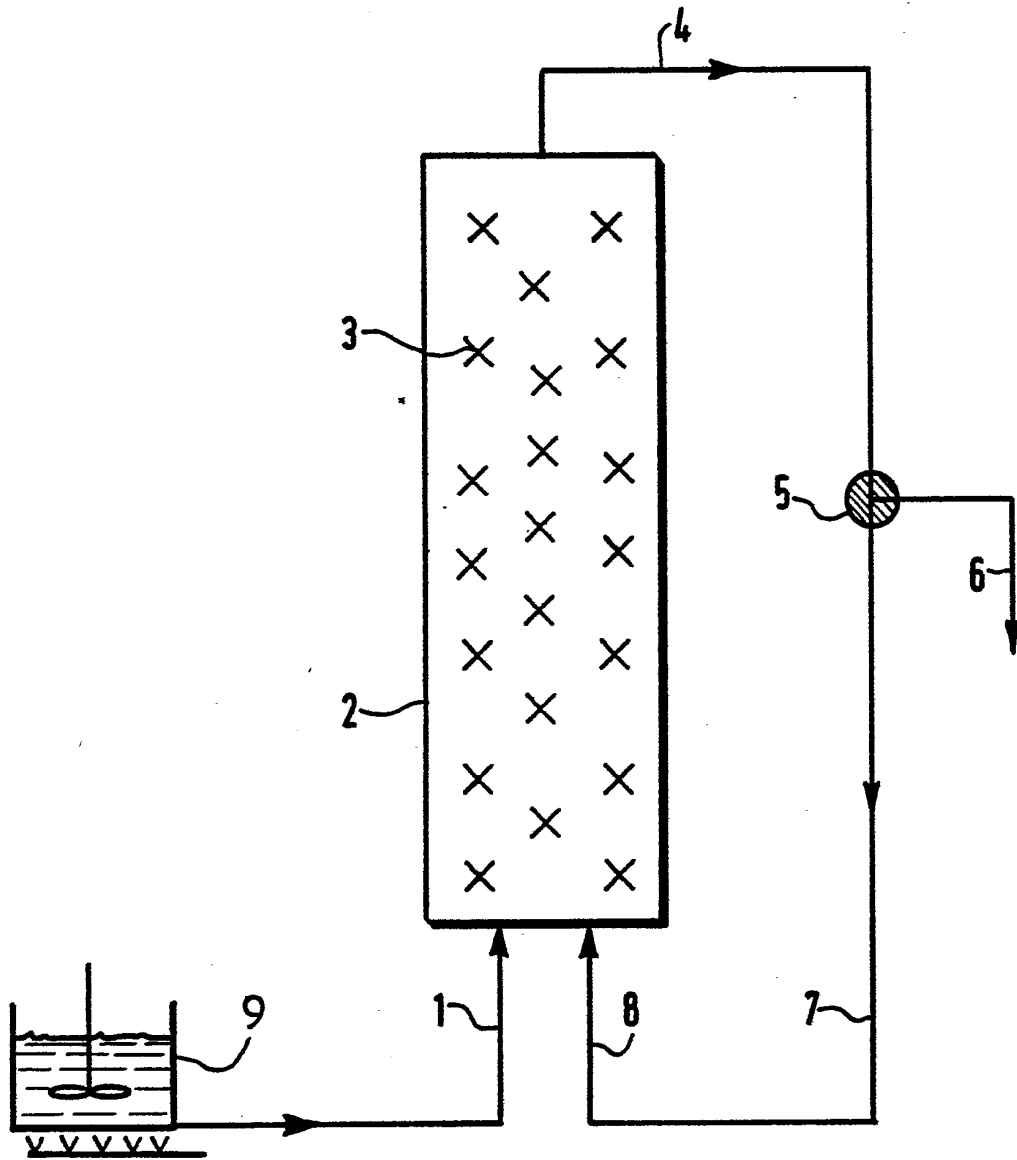
DEPOSANT : GATTEFOSSE S.A.

MANDATAIRE : Cabinet LAURENT

35



1/1



RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14 et L.612-17 du code de la propriété intellectuelle;
articles 40 à 53 du décret n° 79-822 du 19 septembre 1979 modifié

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

Après l'accomplissement de la procédure prévue par les textes rappelés ci-dessus, le brevet est délivré. L'Institut National de la Propriété Industrielle n'est pas habilité, sauf dans le cas d'absence **manifeste** de nouveauté, à en refuser la délivrance. La validité d'un brevet relève exclusivement de l'appréciation des tribunaux.

L'I.N.P.I. doit toutefois annexer à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention. Ce rapport porte sur les revendications figurant au brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- ☒ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Le demandeur a maintenu les revendications.
- ☒ Le demandeur a modifié les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n'étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- ☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- ☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

**1. ÉLÉMENTS DE L'ÉTAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ÊTRE PRIS EN
CONSIDÉRATION POUR APPRÉCIER LA BREVETABILITÉ DE L'INVENTION**

Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
<p>-CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 106, no. 25, 22 juin 1987, page 543, résumé no. 212585b, Columbus, Ohio, US; & JP-A-61 268 192 (MEITO SANGYO CO. LTD) 27/11/1986 * résumé *</p>	1-4
<p>-CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 109, no. 17, 24 octobre 1988, page 599, résumé no. 148020w, Columbus, Ohio, US; & JP-A-63 112 993 (DAIICHI KOGYO SEIYAKU CO. LTD) 18.05.1988 * résumé *</p>	1
<p>-CHEMICAL ABS, vol. 107, no. 17, 26 octobre 1987, page 574, résumé no. 152800b, Columbus, Ohio, US; C. GANCET et al.: "Ester-linkage hydolysis and synthesis byt lipase from killed Rhisopus arrizus mycelium in nonaqueous media", & REV. FR. CORP GRAS 1986, 33(11), 423-30 * Résumé *</p>	1
<p>-CHEMICAL ABSTRACTS, vol. 110, no. 17, 24 avril 1989, page 592, résumé no. 152 818a, Columbus, Ohio, US; & JP-A-62 107 791 (MEITO SANGYO CO. LTD) 19.05.1987 * résumé *</p>	1
<p>-PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, vol. 11, no. 8 (C396) (2455), 9 janvier 1987 & & JP-A-61 186 347 DAIICHI KOGYO SEIYAKU K.K.) 20.08.1986 * résumé *</p>	1
<p>-PATENT ABSTRACTS OF JAPAN, no. 9, no. 200 (C298) (1923), 16 Août 1985 ; & JP-A-60 70 094 (DAIICHI KOGYO SEIYAKU K.K.) 20.04.1985 * résumé *</p>	1

N° d'enregistrement national: 89 06 023

N° de publication:

**2. ÉLÉMENTS DE L'ÉTAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT
L' ARRIÈRE-PLAN TECHNOLOGIQUE GÉNÉRAL**

NEANT

**3. ÉLÉMENTS DE L'ÉTAT DE LA TECHNIQUE
DONT LA PERTINENCE DÉPEND DE LA VALIDITÉ DES PRIORITÉS**

Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
NEANT	